

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 447 862 A1**

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: **91103147.4**

(51) Int. Cl.5: **B01D 53/00**

(22) Anmeldetag: **02.03.91**

(30) Priorität: **21.03.90 DE 4009109**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
**25.09.91 Patentblatt 91/39**

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
**AT CH DE LI**

(71) Anmelder: **FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT  
ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN  
FORSCHUNG E.V.**  
Leonrodstrasse 54  
W-8000 München 19(DE)

(72) Erfinder: **Knackmuss, Hans-Joachim, Prof. Dr.**  
Heimerdingerstrasse 60  
W-7250 Leonberg 5(DE)  
Erfinder: **Ewers, Jens, Dipl.-Chem.**  
Spielbergerstrasse 7  
W-7000 Stuttgart 40(DE)  
Erfinder: **Clemens, Wulf-Christian, Dipl.-Ing.**  
Röckenwiesenstrasse 3  
W-7000 Stuttgart 1(DE)

(54) **Verfahren zur mikrobiologischen Reinigung von mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierten Gasströmen.**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiologischen Reinigung von mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierten Gasströmen. Man präadaptiert geeignete Bakterien, welche mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und welche halogenierte Ethene und/oder halogenierte Butadiene abbauen, indem man sie in einem Bioreaktor mit Isopren und/oder mit Butadien als Kohlenstoff- und Energiequelle für ihre Neubildung oder Regenerierung versorgt, und man leitet den zu reinigenden Gasstrom in einen Bioreaktor, welcher die präadaptierten Bakterien enthält. In diesem Bioreaktor werden die halogenierten Ethene und die halogenierten Butadiene aus dem Gasstrom durch biologischen Abbau mittels der präadaptierten Bakterien entfernt.

EP 0 447 862 A1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiologischen Reinigung von mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierten Gasströmen.

Halogenierte Ethene und halogenierte Butadiene besitzen ein breites Anwendungsspektrum. So werden z.B. chlorierte Ethene in den unterschiedlichsten Bereichen als Lösungs- und/oder als Reinigungsmittel eingesetzt. Kontaminationen von Böden, Wasser und Abluft mit diesen meist flüchtigen Substanzen treten  
5 deshalb sehr häufig auf und führen zu erheblichen Umweltbelastungen.

Die Sanierung belasteter Standorte geschieht vorwiegend durch Boden-Luft-Absaugung. Dabei gehen die flüchtigen Komponenten, z.B. chlorierte Ethene, in den Abluftstrom über, welcher anschließend über Aktivkohlefilter geleitet wird, sodaß die Verunreinigungen, z.B. die chlorierten Ethene, durch Adsorption aus dem Abluftstrom entfernt werden. Anschließend wird die Aktivkohle regeneriert und erneut zur Reinigung  
10 der Abluftströme eingesetzt. Falls eine Regenerierung der Aktivkohle nicht wirtschaftlich ist, wird diese zusammen mit dem Adsorbat verbrannt. Der Einsatz sowie die Regenerierung von Aktivkohle ist meist dann unwirtschaftlich, wenn in dem zu reinigenden Abluftstrom nur geringe Konzentrationen an den zu entfernen- den Verunreinigungen vorhanden sind, so daß die Aktivkohle gemäß Adsorptionsisotherme nur gering  
15 beladen wird und deshalb zur Reinigung der Abluftströme große Mengen an Aktivkohle erforderlich sind. In der Praxis werden Abluftströme, die nur geringe Konzentrationen an Verunreinigungen enthalten, ungereinigt in die Umwelt abgegeben. Andererseits ist man aber aus umweltpolitischen Gründen bestrebt, auch diese Gasströme zu reinigen und zu entsorgen. So wird z.B. Trichlorethylen aus Grundwasserleitern dadurch abgehalten, daß Luft durch das Wasser geleitet wird, damit das Trichlorethylen in die Abluft  
20 übergeht. Die Konzentrationen dieser Gasströme an Trichlorethylen liegen dabei nach einer kurzen Anlaufphase mit hohen Trichlorethylen-Konzentrationen unterhalb der Grenzwerte der TA-Luft. Aufgrund der heutigen gesetzlichen Vorschriften kann deshalb diese Abluft ohne weitere Reinigung in die Atmosphäre abgegeben werden, sodaß letztendlich nur eine Umverteilung des Trichlorethylens stattfindet. Man ist aber bestrebt, durch diese Art der Grundwasserreinigung nicht nur eine Umverteilung des Trichlorethylens zu  
25 bewirken, sondern dieses auch dauerhaft zu entsorgen. Will man Gasströme mit diesen geringen Konzentrationen an Trichlorethylen über Aktivkohle reinigen, so ist dies sehr kostenintensiv, da bei diesen geringen Konzentrationen die Aktivkohle nur gering beladen wird und für eine Reinigung dieser Gasströme riesige Mengen an Aktivkohle erforderlich wären. Eine Regenerierung der Aktivkohle ist ebenfalls nicht wirtschaftlich, sodaß die Entsorgung durch Verbrennen oder Deponierung der Aktivkohle erfolgt.

Eine andere Möglichkeit, um z.B. mit Trichlorethylen kontaminierte Böden zu reinigen, besteht darin, Methan in das Erdreich zu injizieren, um Methan oxidierende Bakterien, die mittels einer Monooxygenase Trichlorethylen epoxidieren können, anzureichern. Der mikrobiologische Abbau von chlorierten Ethenen, z.  
30 B. von Trichlorethylen, durch Methan und Aromaten verwertende Bakterien erfolgt durch den Initialangriff einer Oxygenase auf das chlorierte Ethen und führt zu einem sehr reaktiven Epoxid. Dieses Epoxid alkyliert Proteine und schädigt bzw. deaktiviert somit die Zellen. Wird z.B. als Mikroorganismus ein *Pseudomonas putida* F1 Stamm verwendet, so verringert sich dessen Aktivität für den Abbau von Trichlorethylen nach 20  
35 Minuten um 98 %.

In der EP 0 336 718 wird ein Verfahren beschrieben, mit dem mittels genetisch manipulierter Mikroorganismen Trichlorethylen mikrobiologisch abgebaut wird. Da es sich hierbei um genetisch manipu-  
40 lierte Mikroorganismen handelt, sind vor dessen Einsatz umfangreiche und langwierige Genehmigungsverfahren notwendig. Ferner sind genetische Manipulationen an Mikroorganismen technisch sehr aufwendig, deshalb sehr teuer und somit in vielen Fällen unwirtschaftlich.

Aus der DE 3326057 A1 ist ein Verfahren zur biologischen Abluftreinigung bekannt, es wird ganz allgemein ein Biowäscher beschrieben. Die dort eingesetzte Biologie ist allerdings nur in der Lage, einfach  
45 und zweifach chlorierte Alkane sowie Chlorbenzol und Chlortoluol abzubauen, nicht jedoch chloresubstituierte Alkene wie z.B. Trichlorethen zu mineralisieren.

In der DE 3227678 ist ein Verfahren zur biologischen Reinigung von Abluft beschrieben. Hierbei handelt es sich ganz allgemein um einen Biofilter, und die eingesetzte Biologie ist auch hier nicht in der Lage, halogenierte Alkene zu mineralisieren.

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Gasströme, die mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminiert sind, auf wirtschaftliche  
50 Weise, schnell und einfach gereinigt werden können. Diese Kontaminationen sollen nicht nur aus den Gasströmen entfernt werden, sondern sie sollen auch auf einfache und wirtschaftliche Weise vernichtet werden. Ferner soll das Verfahren in der Lage sein, auch solche Gasströme wirtschaftlich reinigen und  
55 entsorgen zu können, deren Konzentrationen an halogenierten Ethenen und/oder an halogenierten Butadienen sehr gering sind und z.B. unterhalb der Grenzwerte der TA Luft liegen.

Gelöst wird diese Aufgabe dadurch, daß man geeignete Bakterienstämme, welche mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und welche halogenierte Ethene und/oder

halogenierte Butadiene abbauen, präadaptiert, in dem man sie in einem Bioreaktor mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle für die Neubildung oder für die Regenerierung versorgt, daß man den zu reinigenden Gasstrom in einen Bioreaktor leitet, welcher die präadaptierten Bakterien enthält, und daß in diesem Bioreaktor die halogenierten Ethene und die halogenierten Butadiene aus dem Gasstrom durch biologischen Abbau mittels der präadaptierten Bakterien entfernt werden. Geeignete Butadiene zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind z.B. 1,2-Butadien und/oder 1,3-Butadien.

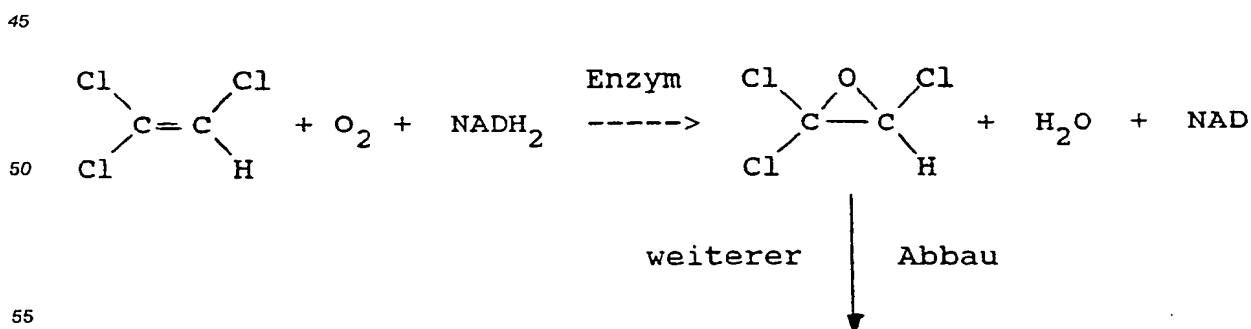
Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich geworden, auch solche Gasströme wirtschaftlich zu reinigen und zu entsorgen, deren Konzentrationen an halogenierten Ethenen und/oder an halogenierten Butadienen sehr gering sind und z.B. unterhalb der Grenzwerte der TA-Luft liegen. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es möglich geworden, auch solche Gasströme wirtschaftlich reinigen und entsorgen zu können, deren Konzentrationen an halogenierten Ethenen und/oder an halogenierten Butadienen im Bereich von 1 - 100 mg/m<sup>3</sup> Luft liegen.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es ferner möglich geworden, auch mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierte Böden oder Abwässer zu reinigen.

Die Reinigung dieser kontaminierten Abwässer erfolgt in einem ersten Verfahrensschritt durch sog. "Strippen" des Abwassers. Dabei wird Luft in das zu reinigende Abwasser eingeblasen, die flüchtigen Kontaminationen treten in den Abluftstrom, und der kontaminierte Abluftstrom wird, wie oben beschrieben, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt.

Die Reinigung der kontaminierten Böden kann auf drei verschiedene Arten erfolgen. In einer ersten Ausführungsform wird Luft in den zu reinigenden Boden eingeblasen, die flüchtigen Kontaminationen treten in den Abluftstrom, und der kontaminierte Abluftstrom wird, wie oben beschrieben, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt. In einer zweiten Ausführungsform wird die Bodenluft zusammen mit den flüchtigen Kontaminationen abgesaugt und, wie oben beschrieben, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigt. Dabei hängt es von der Durchlässigkeit des Bodens ab, ob die erste oder die zweite Ausführungsform zweckmäßiger ist. In einer dritten Ausführungsform wird der kontaminierte Boden einer Bodenwäsche unterzogen, dabei gehen die Kontaminationen in das Waschwasser, und das kontaminierte Waschwasser wird, wie oben für Abwässer beschrieben, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren weiter behandelt.

Überraschender Weise wurde gefunden, daß Bakterien, die mit Isopren und/oder mit Butadien als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, sehr hohe Konzentrationen an halogenierten Ethenen und/oder an halogenierten Butadienen, wie z.B. an Trichlorethylen, tolerieren können. Eine Zellschädigung der auf diese Weise präadaptierten Bakterien durch das entstehende Epoxid wird durch ein Epoxid entgiftendes Enzymsystem verhindert. Dieses Enzymsystem wird mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle induziert. Die Bakterien können also durch das Wachstum mit z. B. Isopren als Strukturanaloga für den Abbau der halogenierten Ethene und/oder der halogenierten Butadienen präadaptiert werden. Bei auf diese Weise präadaptierten Bakterien wird selbst bei hohen Konzentrationen von z.B. Trichlorethylen eine Dehalogenierung beobachtet. So bleibt die Aktivität von präadaptierten Ruhezellen bei Abwesenheit geeigneter Kohlenstoff- und Energiequellen z.B. gegenüber Trichlorethylen mehrere Stunden erhalten und nimmt nur durch den allmählich auftretenden Energiemangel ab. Zur Reaktivierung der Ruhezellen für den Abbau von z.B. Trichlorethylen ist es deshalb erforderlich, diese mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- bzw. als Energiequelle zu regenerieren. Aus der folgenden Reaktionsgleichung ist ersichtlich, daß die präadaptierten Bakterien beim Abbau von z.B. Trichlorethylen keine Energie gewinnen können und deshalb bei nachlassender Aktivität für den weiteren Abbau von Trichlorethylen mit Energie versorgt werden müssen.



Besonders gute Resultate bei der Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erhält man, wenn

es sich bei den zu entfernenden halogenierten Ethenen und/oder halogenierten Butadienen um chlorierte oder bromierte Ethene handelt, wie z.B. um Trichlorethylen, um cis- oder trans-1,2-Dichlorethen oder um Vinylchlorid. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können somit auch Altlasten beseitigt werden, die durch Kontamination mit Perchlorethylen entstanden sind, da Perchlorethylen biologisch unter methanogenen Bedingungen zu dem hochtoxischen und cancerogenen Vinylchlorid abgebaut wird, welches dann nach dem erfindungsgemäßen Verfahren weiter abgebaut werden kann.

Geeignete Bakterien zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erhält man, indem man aus Boden- oder Wasserproben nach bekannten Methoden diejenigen Bakterien mittels Isopren und/oder mittels Butadienen als einzigen Kohlenstoff- und Energiequellen isoliert, die in der Lage sind, Isopren und/oder Butadiene abzubauen. Mit Hilfe eines Schnelltestes werden dann aus diesen Bakterien diejenigen ermittelt, die halogenierte Ethene und/oder halogenierte Butadiene abbauen können. Die so ermittelten und isolierten Bakterien werden dann zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt. Die Anzucht der präadaptierten Bakterien mit Isopren und/oder mit Butadienen kann in jedem beliebigen Fermenter erfolgen.

Überraschender Weise wurde festgestellt, daß auf den Strukturanaloga Isopren und Butadien wachsende Bakterien folgende charakteristische Eigenschaften besitzen können.

1. Eine hohe Toleranz gegenüber halogenierten Ethenen und halogenierten Butadienen, wie z. B. gegenüber Trichlorethylen.
2. Eine hohe Enzymaktivität für halogenierte Ethene und halogenierte Butadiene, wie z. B. für Trichlorethylen.
3. Eine enzymatische Detoxifikation von Zwischenprodukten.
4. Eine langanhaltende Abbauleistung bei Ruhezellen.

Das Enzymsystem für die Detoxifikation der Zwischenprodukte wird durch das Isopren und/oder durch die Butadiene als Kohlenstoff- und Energiequelle induziert. Geeignete Bakterien zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens sind z.B. unter den Alkenverwertern zu finden. Ohne Einschränkung der Allgemeinheit sind geeignete Bakterien zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens z.B. *Alcaligenes denitrificans* ssp. *xylooxidans* Stämme oder *Rhodococcus erythropolis* Stämme.

Die Versorgung der Bakterien mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle kann über die Gasphase erfolgen, oder durch Zugabe der entsprechenden Flüssigkeiten zu den Bakterien-suspensionen. Befinden sich die zuversorgenden Bakterien in einem Bioreaktor, so erfolgt zweckmäßigerweise die Zugabe des Isoprens und/oder der Butadiene über die Gasphase. Befinden sich die zu versorgenden Bakterien in einem geschlossenen System, z.B. in einem Schüttelkolben, so erfolgt die Zugabe, indem die entsprechenden Flüssigkeiten in den Kolben gegeben werden. Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens verwenden Isopren oder 1,3-Butadien als Kohlenstoff- und Energiequelle. Bei weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Versorgung der Bakterien mit Isopren oder mit 1,3-Butadien über die Gasphase, indem gasförmiges Isopren oder gasförmiges 1,3-Butadien dem Luftstrom für die Begasung des Bioreaktors zugemischt wird. Der Anteil z.B. des 1,3-Butadiens am Gasstrom ist dabei abhängig vom Volumenstrom, von der Strömungsgeschwindigkeit im Bioreaktor, von der Biomassenkonzentration im Bioreaktor, vom Nährstoffbedarf der Bakterien und vom Bioreaktortyp, und richtet sich nach den Anforderungen des jeweiligen Einzelfalles. Der Anteil von 1,3-Butadien am Gasstrom kann z.B. 10 000 ppm betragen, er kann aber auch höher oder niedriger sein. Die zum Wachstum bzw. zur Regenerierung der Bakterien erforderlichen Nährsalze werden in bekannter Weise in einem gepufferten System zugegeben.

Die Reinigung des Gasstromes erfolgt durch Einleiten des Gasstromes in den Bioreaktor, welcher die präadaptierten Bakterien für den Abbau enthält. Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens arbeiten mit Blasensäulenreaktoren, mit Festbettreaktoren oder mit Membranreaktoren. Wird ein Blasensäulenreaktor zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt, so wird der zu reinigende Abluftstrom von unten durch die wässrige, die präadaptierten Bakterien enthaltende Biosuspension geleitet. Wird ein Festbettreaktor zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt, so enthält dieser die präadaptierten Bakterien immobilisiert an Füllkörpern, z.B. an Siran<sup>R</sup>-Ringern der Firma Schott. Der zu reinigende Gasstrom wird zusammen mit der wässrigen Phase für die Versorgung der präadaptierten Bakterien durch das Substrat geleitet. Wird ein Membranreaktor zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzt, so wird der zu reinigende Gasstrom durch Hohlfasermembranen, die durch die wässrige, die präadaptierten Bakterien enthaltende Biosuspension führen, geleitet. Die halogenierten Ethene und/oder die halogenierten Butadiene permeieren durch die Membranen in die wässrige Biosuspension und werden dort abgebaut.

Soll der mikrobiologische Abbau der halogenierten Ethene und/oder der halogenierten Butadiene in den oben genannten Ausführungsformen unter sterilen Bedingungen erfolgen, so ist bei Verwendung von Blasensäulenreaktoren bzw. von Festbettreaktoren dem Reaktor ein Sterilfilter vorzuschalten, durch den der

zu reinigende Gasstrom geleitet wird.

Um eine möglichst hohe spezifische Austauschfläche zu erhalten, wird bei einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens in einer Emulsion gearbeitet. Dabei mischt man der wässrigen Phase, welche die präadaptierten Bakterien enthält, wegen des höheren Verteilungskoeffizienten als Adsorptionsmittel ein Öl zu, welches die abzubauenen halogenierten Ethene und/oder die halogenierten Butadiene bevorzugt aufnimmt. Solche Öle können z.B. Rapsöl sein oder auch Siliconöle. Die Verwendung von Rapsöl bietet den Vorteil, daß es sich bei Rapsöl um ein relativ billiges Öl handelt und daß dieses biologisch abbaubar ist. Zur Vergrößerung der Oberfläche zwischen der wässrigen und der lipophilen Phase und damit zur Beschleunigung des biologischen Abbaues der halogenierten und/oder der halogenierten Butadiene wird in einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Stabilisierung der Emulsion ein Emulgator zugegeben. Hierbei kann es sich um biologische oder auch um synthetische Emulgatoren handeln. Geeignete biologische Emulgatoren sind z.B. Lecithine. Ein käuflich erwerbbares Produkt hierfür ist z.B. das Schneidöl Connoxol<sup>®</sup> der Firma Leutze in Metzingen, welches aus Rapsöl und einem Emulgator besteht.

Da die Aktivität der präadaptierten Bakterien für den Abbau der halogenierten Ethene und/oder der halogenierten Butadiene wegen Nahrungsmangel im Laufe der Zeit nachläßt, muß bei einer kontinuierlichen Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens entweder ständig neue, präadaptierte Bakterienmasse verwendet werden, oder bei nachlassender Aktivität der Bakterien müssen diese durch Zugabe von Isopren und/oder von Butadienen regeneriert und deren Enzymsystem neu induziert werden. Soll das erfindungsgemäße Verfahren kontinuierlich oder quasi kontinuierlich durchgeführt werden, so sind hierfür zwei Verfahrensvarianten möglich.

#### Variante I :

Die präadaptierten Bakterien werden in einem Bioreaktor alternierend mit Isopren und/oder mit Butadienen für die Neubildung bzw. für die Regenerierung und die Induzierung und alternierend mit den abzubauenen halogenierten Ethenen und/oder den halogenierten Butadienen versorgt. Mit dieser Variante ist ein quasi kontinuierliches Verfahren ermöglicht, welches z.B. in einem Festbett-, in einem Blasensäulen- oder in einem Membranreaktor durchgeführt werden kann. Die Zeit, die zur Regenerierung der Bakterien und zur Induzierung des Enzymsystems erforderlich ist, hängt von den Erfordernissen des Einzelfalles ab. Werden z.B. Bakterien nach einer Abbauphase von Trichlorethylen mit Isopren regeneriert, und befinden sich diese Bakterien in einem Festbettreaktor, welcher mit Isopren gesättigt ist, so beträgt die Regenerierungszeit ca 10 - 20 % der Betriebszeit mit Trichlorethylen.

Figur 1 zeigt schematisch das erfindungsgemäße Verfahren gemäß der Variante I. Die Bioreaktoren (1) und (2) werden alternierend zum Abbau von z.B. Trichlorethylen eingesetzt. Der mit Trichlorethylen beladene Gasstrom wird in Reaktor (2) geleitet. Hier erfolgt der cooxidative Abbau des Trichlorethylen durch das induzierte Enzymsystem der präadaptierten Bakterien. Auf Grund des einsetzenden Mangels an NADH<sub>2</sub> sinkt die Abbaurate der Bakterien für Trichlorethylen. Vergleiche hierzu die Reaktionsgleichung von Seite 6. Zur Regenerierung der Bakterien und zur erneuten Induzierung des erforderlichen Enzymsystems wird der Gasstrom auf Reaktor (1) geschaltet, und der Reaktor (2) wird mit dem Wachstums- und Regenerierungssubstrat, z.B. mit Isopren, versorgt.

#### Variante II :

Die Bakterien werden in einem Chemostaten präadaptiert und angezüchtet und dann in einen separaten Bioreaktor geleitet, in welchem der Abbau der halogenierten Ethene und/oder der halogenierten Butadiene stattfindet. Mit dieser Variante ist ein kontinuierliches Verfahren ermöglicht, welches z.B. in einem Blasensäulen- oder in einem Membranreaktor durchgeführt werden kann. In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die verbrauchte Biomasse in den Chemostaten zurückgeführt, dort mit Isopren und/oder mit Butadienen regeneriert und erneut in den Bioreaktor zum Abbau der halogenierten Ethene und/oder der halogenierten Butadiene zugeführt. Diese Verfahrensvariante ermöglicht bei einem Dauerbetrieb eine wesentlich ökonomischere Nutzung des Wachstums- bzw. Regenerierungssubstrates, da dieses nicht mehr als Kohlenstoffquelle für die Neubildung der Biomasse, sondern nur noch als Induktor für das erforderliche Enzymsystem und als Energiequelle zur Versorgung der Zellen mit NADH<sub>2</sub> benötigt wird.

Figur 2 zeigt schematisch das erfindungsgemäße Verfahren gemäß der Variante II. Ein als Chemostat betriebener Reaktor (A) liefert ständig aktive, mit Isopren oder mit Butadien gezüchtete oder reaktivierte Biomasse. In einem nachgeschalteten Bioreaktor (B) erfolgt der cooxidative Abbau von z.B. Trichlorethylen. Die Verweilzeit der Zellen in diesem Bioreaktor wird so eingestellt, daß dort stets aktive Zellen zum Abbau

des Trichlorethylens vorhanden sind. Läßt wegen Energiemangels die Abbauaktivität der Zellen nach, so können diese zur Regenerierung und zur Induzierung des erforderlichen Enzymsystems in den Chemostaten (A) zurückgeführt werden.

Die Wahl der Verfahrensvariante und des entsprechenden Bioreaktortyps hängt von den Erfordernissen des jeweiligen Anwendungsfalles ab. So wird man z.B. zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens bei scherpempfindliche Bakterien keinen Blasensäulenreaktor, sondern z.B. einen Festbettreaktor einsetzen.

Im Folgenden wird das erfindungsgemäße Verfahren anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

**Beispiel 1:** (Gewinnung, Isolierung und Reinigung von geeigneten, präadaptierten Bakterien)

Alcaligenes denitrificans ssp. xylosoxidans JE 75 und Rhodococcus erythropolis JE 77 wurden mit Isopren (2-Methyl-1,3-butadien) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle aus einer Wasserprobe isoliert. Die Identifizierung der beiden Stämme erfolgte durch die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig). Für das Wachstum in Flüssigkultur wurde ein Mineralmedium verwendet, welches folgende Komponenten enthielt:

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3.4 g/l;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  : 4.4 g/l;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  : 1 g/l;  $\text{Fe(III)-NH}_4\text{-citrat}$  : 10 mg/l;

$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  : 200 mg/l;  $\text{Ca(NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$  : 50 mg/l;

Spurenelementlösung nach Pfennig und Lippert (N.Pfennig, K.D.Lippert, "Über das Vitamin  $\text{B}_{12}$ -Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien", Arch.Mikrobiol. 55, S. 245 - 256 (1966)) Das Isopren wurde flüssig in die Kulturkolben ( $x_i = 0.001$ ) injiziert. Die Inkubation erfolgte in 100, 500 und 1000 ml Schikanenkolben mit jeweils 10, 50 oder 100 ml Mineralmedium bei  $30^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler (100 Upm). Das Wachstum wurde durch Trübungsmessung bei 546 nm in einem Beckmann-Photometer (DU-50, Fullerton, California, USA) oder in einem Klett-Photometer bestimmt. Zur Reinigung und Isolierung wurden Agarplatten mit Agar No.1 (Oxoid Ltd., London, England) ( $\omega_i = 1.5\%$ ) und Mineralmedium hergestellt. Das Isopren wurde über die Gasphase ( $x_i = 10\%$ ) zudosiert.

**Beispiel 2:** (Screening in Mikrotiterplatten)

Die Abbauaktivität für chlorierte Ethene wurde über eine Bestimmung der Chloridmenge ermittelt. Der Chloridtest von Weightman et al (A.J.Weightman, A.L.Weightman, J.H.Slater, Appl. Environ. Microbiol. 49, S. 1494 - 1501 (1985)) wurde auf in Flüssigkultur angezogene Zellen übertragen. Die in 100 ml Schikanenkolben angezogenen Mischkulturen wurden zentrifugiert ( $6000 \times g$  15 min), zweimal mit 100 mM Tris-Sulfatpuffer (pH 8.0) gewaschen und auf eine optische Dichte von 15 - 20 eingestellt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden mit 100  $\mu\text{l}$  100 mM Tris-Sulfatpuffer (pH 8.0), der 1 mM Trichlorethylen enthielt, versetzt und im Exsikkator bei  $30^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Anschließend wurde jeder Testansatz mit 10  $\mu\text{l}$  0.1 M  $\text{AgNO}_3$ -Lösung versetzt und 15 min mit einer UV-Lampe (Desaga MinUVIS) bestrahlt. Das Auftreten von amorphen Silber ist ein Indikator für die Dehalogenierung, d.h. für den biologischen Abbau des Trichlorethylens.

Figur 3 zeigt die Toleranz von mit Isopren präadaptierten Rhodococcus erythropolis JE 77 gegenüber verschiedenen Trichlorethylen-Konzentrationen (TCE = Trichlorethylen). Die Anzucht erfolgte in 500 ml Klettphotometerkolben. Trichlorethylen wurde unverdünnt in den Kolben injiziert. Die TCE-Konzentrationen wurden unter Annahme vollständiger Löslichkeit in der wässrigen Phase kalkuliert. Ein Maß für die Toleranz der Bakterien ist deren Verdoppelungszeit. Diese wurde ermittelt, indem über Streulichtmessungen die optische Dichte der Bakteriensuspension in Abhängigkeit von der Zeit ermittelt wurde. Gezeigt wird die Hemmung des Wachstums auf Isopren durch unterschiedliche Trichlorethylen-Konzentrationen. Figur 3 zeigt, daß erst bei TCE-Konzentrationen  $\geq 600 \text{ mg/l}$  die Verdoppelungszeit drastisch steigt.

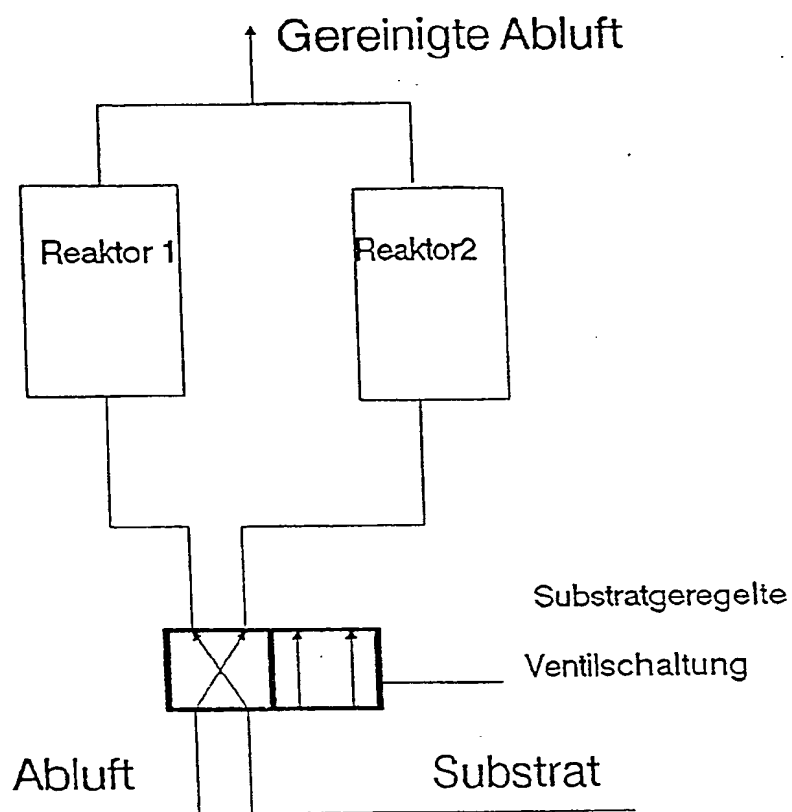
Selbst bei hohen TCE-Werten wurde noch eine Dehalogenierung, d.h. ein biologischer Abbau des Trichlorethylens beobachtet. Die Aktivität der Ruhezellen gegenüber Trichlorethylen bleibt mehrere Stunden erhalten und verlangsamt sich nur durch den allmählich auftretenden Energiemangel. Figur 4 zeigt das Wachstum von Rhodococcus erythropolis JE77 auf Isopren in Gegenwart von 15 ml Trichlorethylen. Die Anzucht erfolgte in einem 1000 ml Schikanenkolben, aus dem mit einer gasdichten Spritze Gasproben gezogen und auf Isopren ( $\Delta$ ) und auf Trichlorethylen ( $\blacktriangle$ ) untersucht wurden. (GC: Injektor-, Detektor- und Ofentemperatur waren  $200^\circ$ ,  $300^\circ$  und  $200^\circ\text{C}$ , FID, Pora PLOT Q-Säule (25mx0.32) mit He (70 kPa Säulenvordruck) als Trägergas). Die Freisetzung von Chlorid ( $\square$ ) wurde mittels Ionenchromatographie bestimmt. Die optische Dichte ( $\blacklozenge$ ) wurde bei 546 nm gemessen. Die Dehalogenierung des Trichlorethylens fand während der stationären Phase statt und wurde über einen Zeitraum von 60 Stunden beobachtet.

**Patentansprüche**

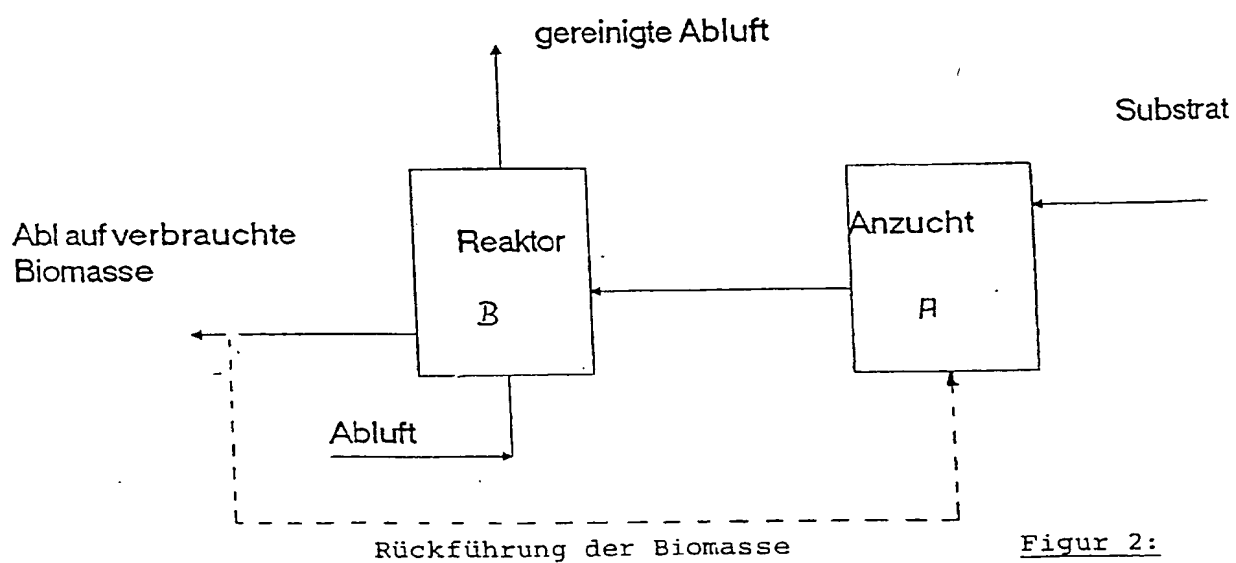
1. Verfahren zur mikrobiologischen Reinigung von mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierten Gasströmen, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Bakterienstämme, welche mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen und welche halogenierte Ethene und/oder halogenierte Butadiene abbauen, mit Isopren und/oder mit Butadienen als Kohlenstoff- und Energiequelle für die Neubildung oder für die Regenerierung präadaptiert und mit dem zu reinigenden Gasstrom in einem Bioreaktor kontaktiert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man kontaminierte Gasströme reinigt, welche durch Einblasen von Luft in mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierten Böden oder Flüssigkeiten entstanden sind.
3. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man kontaminierte Gasströme reinigt, welche durch Absaugen der Bodenluft aus mit halogenierten Ethenen und/oder mit halogenierten Butadienen kontaminierten Böden entstanden sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die präadaptierten Bakterien in einem Bioreaktor alternierend mit Isopren und/oder mit Butadienen versorgt und mit den zu reinigenden Gasstrom kontaktiert.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Bakterien in einem Chemostaten anzüchtet und präadaptiert, und in einem separaten Bioreaktor mit den zu reinigenden Gasstrom kontaktiert.
6. Verfahren nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Bakterien nach dem Kontaktieren mit dem zu reinigenden Gasstrom zurück in den Chemostaten führt.
7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Bakterien mit Isopren und/oder mit Butadienen über die Gasphase versorgt und gasförmiges Isopren und/oder gasförmige Butadiene dem Luftstrom für die Begasung des Bioreaktors zumischt.
8. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die präadaptierten Bakterien in einer Emulsion aus einer die Bakterien enthaltenden, wässrigen Phase und einem die halogenierten Ethene und/oder die halogenierten Butadiene aufnehmenden Öl mit dem zu reinigenden Gasstrom kontaktiert.
9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den zu reinigenden Gasstrom in einen Festbettreaktor über die an Füllkörpern immobilisierten, präadaptierten Bakterien leitet.
10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den zu reinigenden Gasstrom in einen Blasensäulenreaktor durch die wässrige Biosuspension der präadaptierten Bakterien leitet.
11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man den zu reinigenden Gasstrom in einen Membranreaktor durch Hohlfasermembranen leitet, durch die die abzubauenen Schadstoffe in die wässrige, die präadaptierten Bakterien enthaltende Biosuspension permeieren.
12. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Kohlenstoffquelle für die Neubildung und/oder für die Regenerierung der präadaptierten Bakterien bevorzugt Isopren oder 1,3-Butadien verwendet.
13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß man bevorzugt Gasströme reinigt, die chlorierte Ethene enthalten.
14. Verfahren nach Anspruch 13, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Gasströme mit Konzentrationen an chlorierten Ethenen von weniger als 100 mg/m<sup>3</sup> reinigt.



15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Bakterien präadaptiert, die erhalten worden sind, indem man aus Boden- oder Wasserproben nach bekannten Methoden mittels Isopren und/oder mittels Butadienen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle Isopren und/oder Butadien abbauende Bakterien isoliert und mit Hilfe eines Schnelltestes nach bekannten Methoden aus diesen halogenierte Ethene und/oder halogenierte Butadiene abbauende Bakterien ermittelt.
16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, **dadurch gekennzeichnet**, daß man Bakterienstämme der Gattung *Alcaligenes denitrificans* ssp. *xylosoxidans* oder *Rhodococcus erythropolis* präadaptiert.

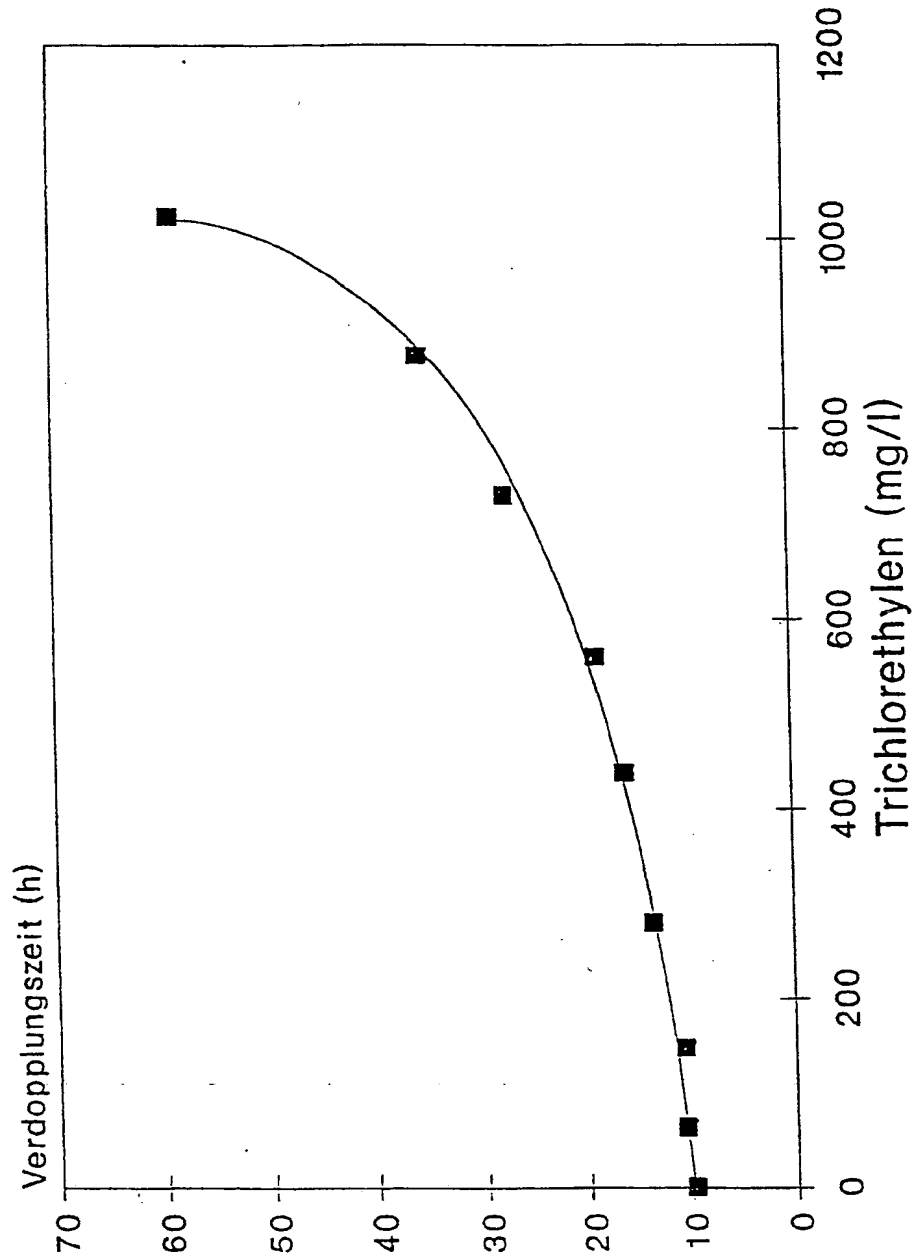


Figur 1:

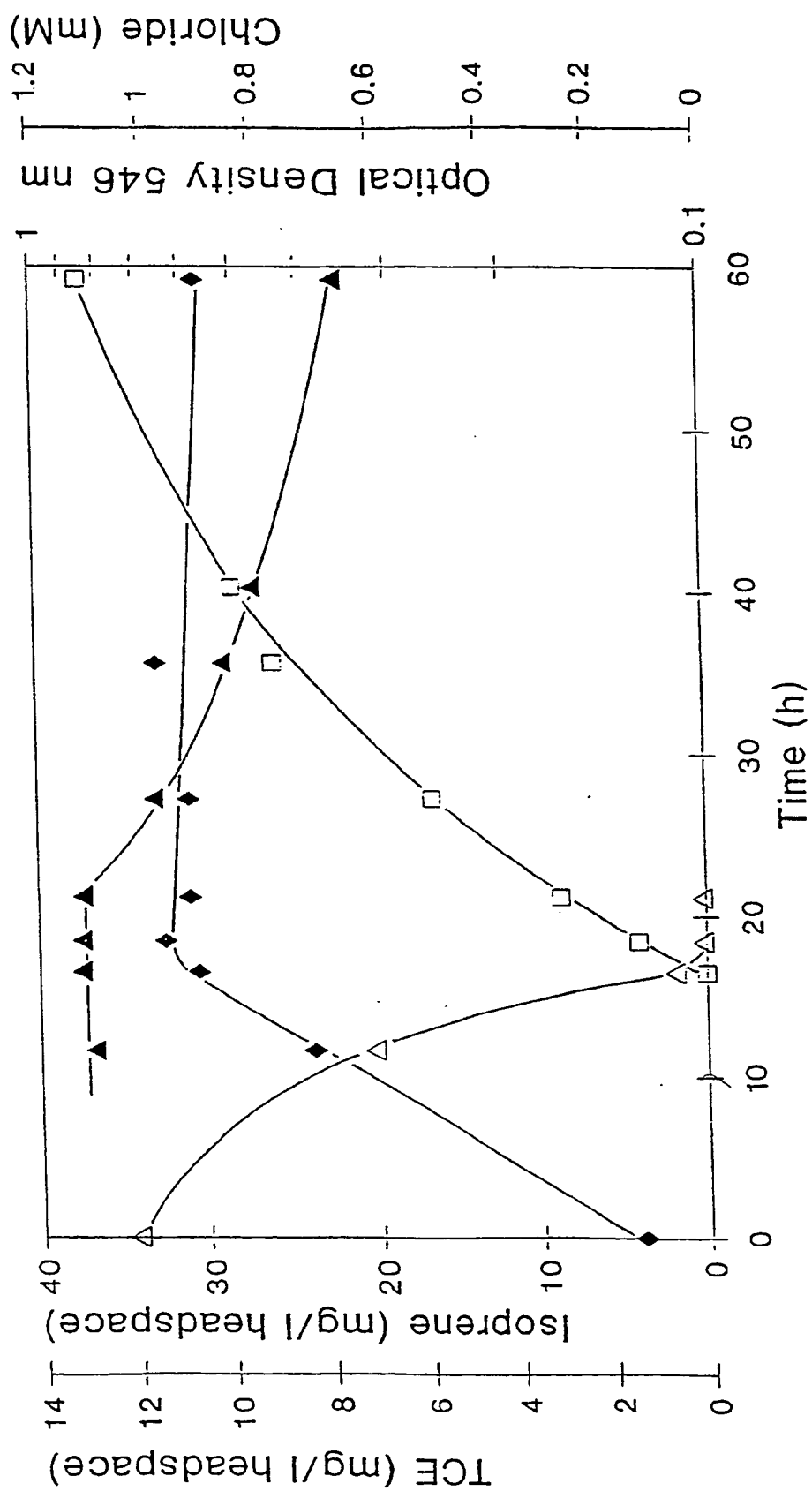


Figur 2:

# Einfluß von TRI auf das Wachstum



Figur 3:



Figur 4:



Europäisches  
Patentamt

## EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 10 3147

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
A,D	DE-A-3 227 678 (BAYER) * Ansprüche 1-10; Beispiel * -----	1-16	B 01 D 53/00
A,D	EP-A-0 336 718 (AMGEN INC.) * Ansprüche 1-15 * -----	1-16	
A	EP-A-0 328 708 (KERAMCHEMIE) * Ansprüche 1-7 * -----	8	
A	GB-A-2 067 092 (DAIMLER-BENZ) * Ansprüche 1-4 * -----		
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
			B 01 D
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort		Abschlußdatum der Recherche	
Den Haag		27 Mai 91	
		Prüfer	
		KANOLDT W.W.	
<div>KATEGORIE DER GENANTEN DOKUMENTE</div> <div>X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet</div> <div>Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie</div> <div>A : technologischer Hintergrund</div> <div>O : nichtschriftliche Offenbarung</div> <div>P : Zwischenliteratur</div> <div>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze</div> <div>E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</div> <div>D : in der Anmeldung angeführtes Dokument</div> <div>L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument</div> <div>&amp; : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</div>			